

## تأثیر محلول پاشی برگ کیتوزان و دی‌اکسید تیتانیوم (بالک و نانو) بر عملکرد و پاسخ‌های بیوشیمیایی اکوتیپ‌های ماریتیغال (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)

سمیرا جعفری<sup>۱</sup>، صادق موسوی‌فرد<sup>۲\*</sup>، عبدالحسین رضایی‌نژاد<sup>۳</sup>، حسن مومیوند<sup>۴</sup> و کریم سرخه<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

پست الکترونیک: Mousavifard.s@lu.ac.ir; Sadeghmosavifard@gmail.com

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۵- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۱

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۰

### چکیده

ماریتیغال (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) گیاهی با کاربردهای متنوع دارویی است که با انواع شرایط آب و هوایی سازگار است. به منظور ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و دی‌اکسید تیتانیوم (بالک و نانو) بر افزایش عملکرد و شاخص‌های بیوشیمیایی اکوتیپ‌های مختلف گیاه ماریتیغال، پژوهشی زراعی به صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دو سال زراعی انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل اکوتیپ‌های ماریتیغال در پنج سطح (بوداکالازی، ساری، خمین، خرم‌آباد و اهواز) و نوع و غلظت الیسیستور در ۹ سطح (محلول پاشی با آب مقطر (شاهد)، کیتوزان بالک (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، نانو کیتوزان (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، دی‌اکسید تیتانیوم بالک (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و نانو دی‌اکسید تیتانیوم (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)) بود. نتایج نشان داد که محلول پاشی کیتوزان و دی‌اکسید تیتانیوم (نانو و بالک) در افزایش عملکرد گیاه و آنزیم‌های دفاعی مؤثر بود. تأثیر محلول پاشی کیتوزان و دی‌اکسید تیتانیوم در فرم نانو روی صفات مذکور نسبت به فرم بالک و شاهد برتری داشت. براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، با محلول پاشی نانوکیتوزان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، عملکرد بوته افزایش یافت. همچنین، محلول پاشی نانوکیتوزان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی شد. به‌طور کلی، کاربرد نانوکیتوزان در افزایش عملکرد و همچنین بهبود خصوصیات بیوشیمیایی اکوتیپ‌های ماریتیغال به‌خصوص اکوتیپ بوداکالازی تأثیرگذار بود که می‌تواند به‌عنوان راهکار مناسبی برای افزایش عملکرد این گیاه باشد. همچنین استفاده از این اکوتیپ در برنامه‌های اصلاحی با توجه به عملکرد بالاتر قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: نانوکیتوزان، آنزیم‌های دفاعی، الیسیستور، مالون‌دی‌آلدئید، بوداکالازی.

## مقدمه

ماریتینال (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) گیاهی دارویی، علفی، یک‌ساله از خانواده Asteraceae و بومی اروپای غربی، مرکزی و شمال هند است که در نقاط مختلف ایران به صورت وحشی می‌روید، اگرچه با توجه به ویژگی‌های دارویی و روغنی توانسته است جایگاه مهمی را در زراعت متابولیکی و صنایع دارویی پیدا کند (Ram et al., 2006). دانه‌های این گیاه حاوی بتائین گلیسین (Glycine betaine) و ویتامین E است. همچنین روغن حاصل از دانه‌های ماریتینال (که متوسط بین ۲۸٪ تا ۴۵٪ می‌باشد) حاوی مقادیر بالایی از ترکیب‌های تغذیه‌ای مانند فسفولیپیدها است که دارای اثرهای ضد التهابی و ضد هیپاتیتی می‌باشد (Fadhil et al., 2012).

امروزه کاربرد فناوری نانو برای افزایش بهبود بهره‌وری در محصولات کشاورزی پر اهمیت است (Thakur et al., 2022). به دلیل اینکه دیواره سلول گیاهی به عنوان یک مانع برای ورود آسان هر عامل خارجی به داخل سلول‌های گیاهی عمل می‌کند، نانوذرات که قطر منفذ کمتری نسبت به قطر منفذ دیواره سلولی دارند (بین ۱ تا ۱۰ نانومتر) به راحتی می‌توانند از منافذ روی دیواره عبور کنند (Schaller & Klimov, 2004). نانو ذرات در سطح برگ از طریق منافذ روزنه‌ای وارد گیاه می‌شوند و بعد به بافت‌های مختلف منتقل می‌گردند. تأثیر نانو ذرات بستگی به ترکیب، غلظت، اندازه، خواص فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات و نیز بستگی به گونه‌های گیاهی، مرحله رشدی گیاه، روش و مدت زمان قرار گرفتن در معرض آن دارد (Ma et al., 2015).

کیتوزان از جمله محرک‌های زیستی می‌باشد که باعث تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان می‌شود. کیتوزان با داشتن خصوصیات بیولوژیک و فیزیولوژیک منحصر به فرد کاربردهای متعددی در صنایع مختلف دارویی، پزشکی و کشاورزی دارد (Malekpoor et al., 2017). نانومواد کیتوزان در محیط‌های آبی بسیار محلول هستند و در مقایسه با کیتوزان فعالیت بیشتری دارند. از این رو، نانومواد کیتوزان و همچنین نانوکامپوزیت‌های مبتنی بر کیتوزان در کاربردهای مختلف مورد

استفاده قرار می‌گیرند (Suhās et al., 2015). البته، نقش مثبت کیتوزان بر رشد پروانش (Ali et al., 2021) آویشن (Emami Ghasemi Pirbalouti et al., 2017) و ریحان (Bistgani et al., 2017) نیز گزارش شده است. همچنین اثربخشی نانوذرات کیتوزان را به عنوان یک محرک رشد در بهبود عملکرد و فعالیت بیولوژیکی برنج مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند کاربرد نانوکیتوزان پارامترهای رشد و عملکرد را در این گیاه افزایش می‌دهد (Divya et al., 2022).

تیتانیوم عنصری سودمند برای گیاه است و می‌تواند جذب برخی عناصر مانند نیتروژن، فسفر، کلسیم، منیزیم، آهن، منگنز و روی را تحریک کند و باعث افزایش و تحریک رشد شود (Pais, 1983). دی‌اکسید تیتانیوم، یک اکسید معدنی غیر سیلیکاتی طبیعی است که در شکل‌های مختلف (آاناتاز (Anatase)، روتیل (Rutile) و بروکایت (Brookite)) وجود دارد (Crabtree, 1998). نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، به دلیل نقش مهم آن در تنظیم طیف گسترده‌ای از فرایندها (تنظیم فعالیت‌های مهم آنزیمی مانند گلوتامات دهیدروژناز (Nitrate reductase)، نترات ردوکتاز (Glutamate dehydrogenase)، گلوتامین سنتاز (Glutamine synthase) و غیره) در گیاهان شناخته شده است. بنابراین با توجه به فعالیت‌های شناخته شده آنها می‌تواند به گیاه کمک کند تا مواد مغذی بیشتری را برای تولید متابولیت‌ها ایجاد کند که در نهایت منجر به افزایش رشد و نمو گیاهان شود (Mishra et al., 2014). مطالعه Karvar و همکاران (۲۰۲۲) اثر مثبت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر عملکرد دانه ذرت شیرین را نشان داد. همچنین، گزارش شده است که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه گشنیز (Hu et al., 2020) و باقلا (Khan et al., 2020) شد.

با توجه به اهمیت گیاه ماریتینال از نظر دارویی و فراهم بودن شرایط کشت این گیاه در کشور از نظر شرایط اقلیمی و موقعیت جغرافیایی، مطالعه و تحقیق پیرامون افزایش عملکرد آن تحت تأثیر الیستورها مهم به نظر می‌رسد. در همین راستا، در این مطالعه تأثیر کیتوزان و دی‌اکسید تیتانیوم در دو فرم بالک

شخم عمیق زده شد و بعد از خرد کردن کلوخه‌ها با دیسک، کودهای شیمیایی مورد نیاز به خاک اضافه، سپس زمین تسطیح شد. اولین آبیاری برای سبز شدن بذرها در ماه آبان انجام گردید و آبیاری‌های دیگر در صورت نیاز انجام شد. وجین علف‌های هرز به صورت دستی انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و ۴۵ تیمار اجرا گردید. فاکتور اول شامل اکوتیپ‌های ماریتیغال (ساری، خمین، خرم‌آباد، اهواز و بودا کلازی) و فاکتور دوم شامل نوع و غلظت الیستور با ۹ سطح (صفر (آب مقطر)، کیتوزان بالک و نانو با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، دی‌اکسید تیتانیوم بالک و نانو با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. کیتوزان با وزن مولکولی متوسط ساخت شرکت سیگما آلدریج آمریکا بود که در آزمایشگاه به نانوذره تبدیل شد (Anitha *et al.*, 2009). دی‌اکسید تیتانیوم و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد) تهیه گردید. محلول پاشی روی اندام هوایی گیاه ماریتیغال در دو مرحله ظهور گل آذین و گلدهی انجام شد.

و نانو در غلظت‌های مختلف به صورت محلول پاشی برگی بر عملکرد و فعالیت برخی از آنزیم‌ها در اکوتیپ‌های مختلف گیاه ماریتیغال بررسی شد. از این رو، این مطالعه با هدف شناسایی بهترین اکوتیپ و تعیین مناسب‌ترین غلظت و نوع الیستور برای افزایش عملکرد و ارزیابی اکوتیپ‌های مختلف انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و روش انجام آزمایش

برای بررسی تأثیر محلول پاشی برگی الیستورهای کیتوزان و دی‌اکسید تیتانیوم در دو فرم بالک و نانو بر عملکرد و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ماریتیغال، آزمایشی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان (طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۲۲ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۲۹ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۱۲۵ متر از سطح دریا) در دو سال زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۹ و ۱۴۰۰-۱۳۹۹ اجرا شد. قبل از شروع آزمایش از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری خاک مزرعه برای تعیین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه برداری شد (جدول ۱). برای آماده‌سازی خاک برای کشت ماریتیغال، زمین

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

Table 1. Physical and chemical characteristics of experimental field soil

Texture	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	EC (dS.m <sup>-1</sup> )	O.C (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
Clay	45.3	32.2	22.5	2.4	0.4	0.06	11.8	275

نمونه برگی پودر شده میزان ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP: Polyvinylpolypyrrolidone) و EDTA (Ethylenediamine tetra acetic acid) اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به مدت ۲ دقیقه، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در طول موج ۲۴۰ نانومتر

### ویژگی‌های مورد مطالعه

عملکرد بوته: در زمان برداشت، عملکرد تک بوته اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری عملکرد بوته توده بذری کاپیتول اصلی و فرعی هر تیمار مخلوط گردید، سپس وزن بذرها توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

### آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

کاتالاز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز به ۰/۳ گرم

با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Maehly, 1954).

بافت بیان گردید (Nakano & Asada, 1981).

سوپراکسیددیسموتاز: برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز محلول واکنش در حجم نهایی یک میلی‌لیتر شامل ۸۳۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار، ۶۶ میکرولیتر ریوفلاوین و ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به نمونه شاهد در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Beauchamp & Fridovich, 1971).

نشت الکترولیت: برای محاسبه نشت الکترولیت، از برگ‌های کاملاً توسعه یافته هر تیمار قطعات دایره‌ای یکسان تهیه شد. سپس قطعات برگ هر تیمار جداگانه در ظروف شیشه‌ای درپوش‌دار محتوای ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شد. این ظروف به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند، پس از ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی ( $EC_1$ ) محلول با استفاده از  $EC_2$  متر اندازه‌گیری شد. پس از آن، برای بررسی نشت الکترولیت سلول‌های مرده ظروف را دو بار در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده و پس از سرد شدن شیشه‌ها دوباره هدایت الکتریکی محلول ( $EC_2$ ) اندازه‌گیری شد. درصد نشت الکتریکی از غشاءها مطابق رابطه ۱ محاسبه می‌گردد (Lutts *et al.*, 1996).

پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز، به عصاره آنزیمی ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار و ۵۰ میکرولیتر مایع گایاکول (Gayagol) خالص به‌عنوان پذیرنده الکترون و بعد ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳٪ به‌عنوان الکترون دهنده اضافه شد و بلافاصله تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۷۵ نانومتر در فواصل زمانی ۱۵ ثانیه به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید. در نهایت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برحسب میزان آب اکسیژنه غیرفعال شده در یک دقیقه در گرم تر گیاه بیان شد (MacAdam *et al.*, 1992).

آسکوربات پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میکرولیتر محلول اندازه‌گیری آسکوربیک پراکسیداز که شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم (pH=۷)، ۰/۱ میلی‌مول EDTA، ۰/۵ میلی‌مولار اسید آسکوربیک و ۰/۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن بود مخلوط شد. سپس جذب آن در طول موج ۲۹۰ نانومتر بعد از مدت یک دقیقه خوانده شد. در نهایت، مقدار فعالیت آنزیم بر حسب میزان آب‌اکسیژنه غیرفعال شده در یک دقیقه در هر گرم وزن تازه

$$\text{رابطه ۱} \quad (\text{EL}) \text{ Electrolyte leakage (\%)} = (\text{EC}_1/\text{EC}_2) \times 100$$

آب‌گرم (بن‌ماری) حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله در یخ سرد شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتیفرز گردیدند، آنگاه شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۵۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (Zhao *et al.*, 1994). غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

مالون‌دی‌آلدئید: برای اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید غشاء، ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ‌گی توزین و در هاون چینی توسط نیتروژن مایع سائیده شد، سپس ۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪ که حاوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid) بود اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس حمام

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{MDA: Malondialdehyde } (\mu\text{mol g}^{-1} \text{ Fw}) = 6.45[\text{A}532-\text{A}600]-0.56[\text{A}450]$$

لیتر) و کمترین مقدار آن به ترتیب (۳۰/۱۸ و ۲۹/۸۰ گرم) مربوط به اکوتیپ‌های خرم‌آباد و اهواز در شرایط محلول پاشی با آب مقطر بود (جدول ۳).

### آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر اکوتیپ، محلول پاشی و اثرهای متقابل آنها بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار شد ( $P < 0.01$ ). مقایسه میانگین برهم‌کنش اکوتیپ در محلول پاشی نشان داد که مصرف الیسیتورهای کیتوزان و دی‌اکسیدتیتانیوم در همه اکوتیپ‌ها موجب افزایش فعالیت آنزیم‌ها شد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌ها در شرایط محلول پاشی با الیسیتورها در فرم نانو نسبت به فرم بالک بیشتر مشاهده شد. در اکوتیپ‌های مورد مطالعه مصرف نانوکیتوزان نسبت به نانودی‌اکسیدتیتانیوم موجب فعالیت بیشتر آنزیم‌ها شد و این افزایش در غلظت بالاتر مصرف نانوکیتوزان بیشتر مشاهده شد.

برهم‌کنش اکوتیپ‌ها با محلول پاشی الیسیتورها نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در اکوتیپ بودا کالازی همراه با محلول پاشی نانوکیتوزان در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۵/۸۹ و ۱۵/۷۹ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) مشاهده گردید. پایین‌ترین فعالیت کاتالاز نیز (۱/۰۶ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در اکوتیپ خمین در شرایط محلول پاشی با آب مقطر مشاهده شد. براساس مقایسه میانگین‌ها بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز (۱۰/۰۷ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در اکوتیپ خمین در شرایط محلول پاشی با نانوکیتوزان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان فعالیت این آنزیم (۲/۰۶ و ۱/۹۳ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در اکوتیپ‌های خرم‌آباد و ساری در شرایط محلول پاشی با آب مقطر حاصل شد.

پراکسید هیدروژن: برای سنجش مقدار پراکسید هیدروژن، ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ در تری‌کلرواستیک اسید ۱٪ سائیده شد. عصاره حاصل با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس به ۷۵۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰۰ میلی‌مولار) و ۱/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم (۱ مولار) اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Alexieva et al., 2001).

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این پژوهش دوساله به صورت تجزیه مرکب با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (Ver 9.4) و مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

### نتایج

#### عملکرد بوته

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر نوع اکوتیپ، محلول پاشی الیسیتورها و اثر متقابل آنها بر شاخص عملکرد بوته معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) شد که نشان‌دهنده وجود تنوع بالا از لحاظ صفت مورد بررسی در اکوتیپ‌های مورد مطالعه و همچنین اثر معنی‌دار الیسیتورها بر این ویژگی است. مقایسه میانگین این صفت نشان داد که محلول پاشی کیتوزان و دی‌اکسیدتیتانیوم در فرم نانو در مقایسه با فرم معمولی تأثیر بیشتری بر عملکرد بوته داشت. همچنین، این افزایش در تیمارهای نانو کیتوزان بیشتر از نانو تیتانیوم دی‌اکسید بود. مقایسه میانگین اکوتیپ و سطوح تیمار محلول پاشی نشان داد که بیشترین عملکرد بوته (۹۱/۵۵ گرم) در اکوتیپ بودا کالازی و محلول پاشی نانوکیتوزان (۵۰ میلی‌گرم در

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر محلول پاشی برگه کیتوزان و دی اکسید تیتانیوم (بالک و نانو) روی عملکرد و پاسخ های بیوشیمیایی اکوتیپ های ماریتیغال

**Table 2. ANOVA of chitosan and titanium dioxide (bulk and nano) foliar application on plant yield and biochemical responses of *Silybum marianum* ecotypes**

Means of Square									
S.O.V	d.f.	Plant yield	CAT	POD	APX	SOD	EL	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Year (Y)	1	37.72 <sup>ns</sup>	0.23 <sup>ns</sup>	0.32 <sup>ns</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	1.44 <sup>ns</sup>	1.40 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>	10.05 <sup>ns</sup>
Replication (Year) (a)	4	6.81	0.07	0.53	0.005	0.75	35.60	0.00005	3.97
Ecotype (A)	4	4807.31 <sup>**</sup>	85.02 <sup>**</sup>	27.37 <sup>**</sup>	0.22 <sup>**</sup>	214.61 <sup>**</sup>	45.6 <sup>**</sup>	0.0079 <sup>**</sup>	82.49 <sup>**</sup>
Foliar application (B)	8	3248.63 <sup>**</sup>	334.11 <sup>**</sup>	155.23 <sup>**</sup>	2.77 <sup>**</sup>	214.77 <sup>**</sup>	76.62 <sup>**</sup>	0.001 <sup>**</sup>	20.83 <sup>**</sup>
A × Y	4	4.46 <sup>ns</sup>	0.06 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	0.002 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.47 <sup>ns</sup>	0.000009 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>
B × Y	8	1.80 <sup>ns</sup>	0.13 <sup>ns</sup>	0.06 <sup>ns</sup>	0.0007 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.53 <sup>ns</sup>	0.00001 <sup>ns</sup>	1.07 <sup>ns</sup>
A × B	32	74.5 <sup>**</sup>	23.74 <sup>**</sup>	3.67 <sup>**</sup>	0.04 <sup>**</sup>	91.3 <sup>**</sup>	30.27 <sup>**</sup>	0.0004 <sup>**</sup>	3.23 <sup>ns</sup>
A × B × Y	32	1.33 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.0005 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	0.81 <sup>ns</sup>	0.00001 <sup>ns</sup>	1.43 <sup>ns</sup>
CV (%)		2.7	6.98	12.23	10.92	5.67	6.77	21.58	8.28

ns, \*, and \*\*: not significant and significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

CAT: Catalase, POD: Peroxidase, APX: Ascorbate peroxidase, SOD: Superoxide dismutase, EL: Electrolyte leakage, MDA: Malondialdehyde, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hydrogen peroxide.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ و محلول پاشی برگه کیتوزان و دی اکسید تیتانیوم (بالک و نانو) بر عملکرد و پاسخ های بیوشیمیایی اکوتیپ های ماریتیغال

**Table 3. Means comparison of ecotype × chitosan and titanium dioxide (bulk and nano) foliar application interaction effects on plant yield and biochemical responses of *Silybum marianum* ecotypes**

Ecotype	Foliar application	Plant yield	CAT	POD	APX	SOD	EL	MDA
	(mg/l)	(g/per plant)		( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$ )			(%)	( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ )
Sari (SA)	Control	39.52 t	3.69 t-v	1.93 t	0.16 uv	29.57k-m	47.96 i-k	0.0400 e-k
	Ti 50	51.92 lm	4.34 q-s	3.86 o-q	0.24 q-s	32.49 ij	50.32 d-k	0.0333 i-m
	Ti 100	54.89 k	4.87 pq	5.07 j-l	0.45 m-o	35.55 hi	52.10 b-h	0.0333 i-m
	Ti NP 50	60.71 hi	5.47 no	6.54 ef	0.48 k-m	35.69 f	50.49 d-k	0.0383 f-k
	Ti NP 100	63.78e-g	6.10 lm	8.64 c	0.74 fg	39.09 f	52.62 a-g	0.0500 de
	Ch 50	54 k	5.34 op	5.24 jk	0.46 m-o	33.45 hi	52.86 a-f	0.0483 d-f
	Ch 100	56.93 j	5.39 no	6.25 f-h	0.46 l-o	36.03 g	53.84 a-d	0.0466 d-g
	Ch NP 50	76.69 c	7.27 i	8.48 c	0.83 e	40.35 ef	48.40 h-k	0.0266 l-n
	Ch NP 100	75.41 c	11.57 e	9.56 ab	1.13 b	53.48 b	52.81 a-f	0.0500 de
Khomain	Control	36.94 u	1.06 c'	2.39 st	0.16 uv	25.42 op	47.33 jk	0.0116 p
	Ti 50	42.93 r	1.41 b'c'	3.01 rs	0.19 s-u	34.07 g-i	52.20 b-h	0.0350 h-l
	Ti 100	50.90mn	1.72 a'b'	4.02 n-p	0.32 p	34.42 g-i	52.82 a-f	0.0450 d-h

ادامه جدول ۳- ....  
Continued Table 3. ...

Ecotype	Foliar application	Plant yield	CAT	POD	APX	SOD	EL	MDA
	(mg/l)	(g/per plant)		$(\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW})$			(%)	$(\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW})$
	Ti NP 50	54.51 k	5.37 o	6.31 gf	0.56 j	39.24 f	51.62 b-i	0.0416 d-j
	Ti NP 100	54.96 k	11.37 e	7.24 de	0.8 ef	40.44 ef	52.15 b-h	0.0433 d-i
	Ch 50	51.10mn	3.26 vw	6.16 f-i	0.40 o	35.20 gh	32.03 b-h	0.0400 e-k
	Ch 100	53.53 kl	4.74 qr	6.69 d-f	0.42 no	38.56 f	54.56 a-c	0.0383 f-k
	Ch NP 50	65.28 de	12.08 d	9.41 ab	0.91 d	42.40 e	49 f-k	0.0366 g-l
	Ch NP 100	62.13 gh	13.48 c	10.07 a	1.05 c	42.66 e	53.55 a-e	0.0500 de
	Control	30.81 w	1.51 a'-c'	2.06 t	0.17 t-v	18.26 q	48.66 g-k	0.0216m-o
	Ti 50	34.55 v	2.99 wx	2.48 st	0.17 t-v	24.34 p	51.33 c-j	0.0766 a
	Ti 100	37.67 u	3.49 uv	3.10 q-s	0.27 q-s	24.60 p	52.76 a-f	0.0716 ab
	Ti NP 50	46.66 q	5.80m-o	3.90 op	0.48 k-n	40.69 ef	51.61 b-i	0.0633 b
Khorram Abad	Ti NP 100	48.73 op	5.87 mn	7.14 de	0.48 k-m	40.86 ef	52.51 a-g	0.0616 bc
	Ch 50	40.41 st	3.97 s-u	3.49 t-r	0.25 q-s	29.42 k-n	53.24 a-e	0.0666 ab
	Ch 100	46.74 q	4.03 st	3.86 o-q	0.27 p-r	30.18 j-l	56.27 a	0.0700 ab
	Ch NP 50	54.43 k	6.61 jk	7.38 d	0.8 ef	41.75 e	49 f-k	0.0483 d-f
	Ch NP 100	49.82 no	8.10 h	9.65 ab	0.8 ef	45.62 d	53.08 a-e	0.0700 ab
	Control	29.80 w	2.64 xy	3.35 p-r	0.12 v	25.36 op	49.78 e-k	0.0416 d-j
	Ti 50	40.57 st	4.17 st	3.48 p-r	0.13 v	27.41 m-o	52 b-h	0.0333 i-m
	Ti 100	40.89 st	4.44 q-s	4.09 m-p	0.21 r-u	28.31 l-n	50.77 c-k	0.0400 e-k
Ahvaz	Ti NP 50	49.07 op	6.13k-m	5.21 jk	0.52 j-l	35.05 gh	51.41 c-i	0.0466 d-g
	Ti NP 100	54.37 k	6.38 kl	5.41 i-k	0.59 ij	41.58 e	51.68 b-i	0.0516 cd
	Ch 50	41.61 rs	5.37 no	4.71 k-n	0.43 m-o	30.56 j-l	53.72 a-e	0.0433 d-i
	Ch 100	46.97 q	5.47 no	5.10 j-l	0.48 k-m	34.63 g-i	55.49 ab	0.0416 d-j
	Ch NP 50	62.64 g	9.16 g	5.64 g-j	0.63 hi	41.82 e	48.58 g-k	0.0383 f-k
	Ch NP 100	59.89 i	9.71 f	9.23 bc	1.17 b	58.46 a	51.34 c-j	0.0483 d-f
	Control	47.70 pq	1.97 za'	2.99 rs	0.16 uv	24.23 p	46.91 k	0.0300 k-n
	Ti 50	53.98 k	2.44 yz	4.39 l-o	0.23 q-t	27.16 no	51.39 c-i	0.0333 i-m
Budakalazi	Ti 100	54.79 k	4.29 rs	4.89 j-m	0.27 p-r	30.68 jk	52.10 b-h	0.0316 j-n
	Ti NP 50	65.53 d	6.93 ij	6.53 d-f	0.67 h	35.01 gh	52.53 a-g	0.0266 l-n
	Ti NP 100	79.83 b	14.70 b	6.77 h-k	0.69 gh	50.66 c	52.79 a-f	0.0233m-o
	Ch 50	63.14 fg	5.54 no	5.46 h-k	0.29 pq	31.08 jk	437.89i-k	0.0233m-o
	Ch 100	64.68 d-f	6.14k-m	6.60 d-f	0.53 jk	34.24 g-i	41.38 l	0.0136 j-n
	Ch NP 50	91.55 a	15.89 a	9.81 ab	0.91 d	51.11 b	49.95 d-k	0.0200 op
	Ch NP 100	80.99 b	15.79 a	10.02 ab	1.23 a	56.23 a	52.39 a-h	0.0333 i-m

In each column, means with the same letters are not significantly different at 5% probability level (LSD test).

CAT: Catalase, POD: Peroxidase, APX: Ascorbate peroxidase, SOD: Superoxide dismutase, EL: Electrolyte leakage, MDA: Malondialdehyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hydrogen peroxide, Ti: Titanium dioxide, Ti NP: Nano titanium dioxide, Ch: Chitosan, and Ch NP: Nano chitosan.

مورد صفت مالون‌دی‌آلدئید نشان داد که اثر اکوتیپ و تیمارهای مختلف محلول‌پاشی و اثر متقابل اکوتیپ در محلول‌پاشی در سطح ۱٪ معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) شد اما اثر سال و اثر سه‌گانه سال در اکوتیپ در محلول‌پاشی بر این صفت معنی‌دار نشد. نتایج نشان داد در میان اکوتیپ‌های مورد مطالعه کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید مربوط به اکوتیپ بوداکالازی به میزان ۰/۰۲۷ میکرومول بر گرم وزن تر بود و در میان تیمارهای مختلف محلول‌پاشی کمترین میزان آن مربوط به تیمار شاهد و نانوکیتوزان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان به ترتیب ۰/۰۲۹٪ و ۰/۰۳۳٪ بود که با یکدیگر اثر معنی‌دار نداشتند (نتایج اثرهای اصلی نشان داده نشده است). نتایج بدست آمده از مقایسه آماری میانگین اثر متقابل اکوتیپ در محلول‌پاشی نشان داد که کمترین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء مربوط به اکوتیپ‌های خمین و بوداکالازی به ترتیب در شرایط محلول‌پاشی با آب مقطر و نانوکیتوزان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (جدول ۳).

#### پراکسید هیدروژن

نتایج تجزیه واریانس مرکب (جدول ۲) میزان پراکسید هیدروژن نشان داد که اثر اکوتیپ و مقادیر محلول‌پاشی در سطح ۱٪ معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) شد، اما اثر سایر منابع بر این صفت معنی‌دار نبود. در بررسی اکوتیپ مشاهده می‌شود که بیشترین میزان پراکسید هیدروژن در اکوتیپ اهواز با ۲۳/۰۹ میکرومول بر گرم وزن تر و کمترین میزان آن در اکوتیپ بوداکالازی با ۱۹/۹۶ میکرومول بر گرم وزن تر بدست آمد. طبق مقایسه میانگین‌ها، تیمار محلول‌پاشی نانوکیتوزان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به طور معنی‌داری میزان پراکسید هیدروژن را به مقدار ۲۱/۸۱ میکرومول بر گرم وزن تر در مقایسه با تیمار شاهد (محلول‌پاشی با آب مقطر) افزایش داد (شکل ۱).

بررسی اثر متقابل تیمارها نشان داد بالاترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۱/۲۳ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در اکوتیپ بوداکالازی همراه با محلول‌پاشی نانوکیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان آن (۰/۱۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در اکوتیپ اهواز در شرایط محلول‌پاشی با آب مقطر بدست آمد.

همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد کاربرد نانوکیتوزان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در اکوتیپ‌های اهواز و بوداکالازی باعث افزایش به ترتیب (۵۸/۴۶ و ۵۶/۲۳ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شد و کمترین میزان فعالیت این آنزیم (۱۸/۲۶ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در اکوتیپ خرم‌آباد و در شرایط محلول‌پاشی با آب مقطر مشاهده گردید (جدول ۳).

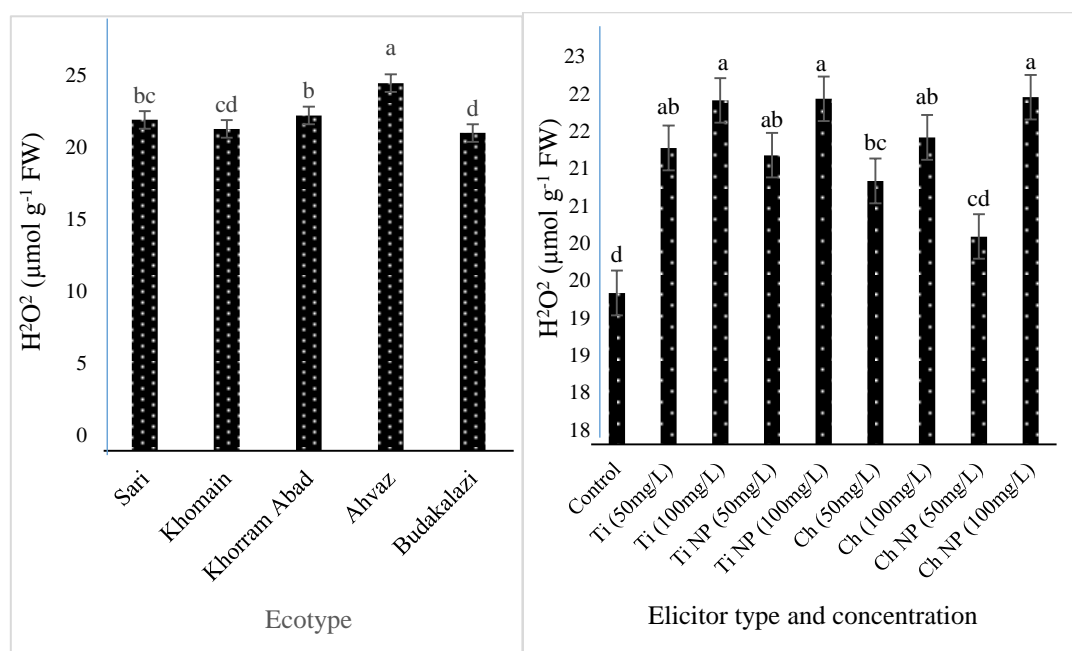
#### نشت الکترولیت

تجزیه واریانس مرکب داده‌ها (جدول ۲) نشان داد اثر اکوتیپ، محلول‌پاشی الیستورها و برهم‌کنش آنها بر میزان نشت الکترولیت معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) شد، اما اثر سال و اثر سه‌گانه سال در اکوتیپ در محلول‌پاشی معنی‌دار نشد. نتایج نشان داد در میان پنج اکوتیپ ماریتیغال کمترین نشت الکترولیت مربوط به اکوتیپ بوداکالازی (۴۹/۷۱٪) بود. در میان تیمارهای مختلف محلول‌پاشی کمترین نشت مربوط به تیمار شاهد و نانوکیتوزان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان به ترتیب ۴۸/۱۳٪ و ۴۸/۹۹٪ بود که اثرشان با یکدیگر معنی‌دار نشد (نتایج اثرهای اصلی نشان داده نشده است). بررسی اثر متقابل اکوتیپ در محلول‌پاشی الیستورها نشان داد که کمترین میزان نشت الکترولیت (۴۱/۳۸٪) مربوط به اکوتیپ بوداکالازی و کاربرد کیتوزان (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود (جدول ۳).

#### مالون‌دی‌آلدئید

نتایج تجزیه واریانس مرکب آزمایش (جدول ۲) در





شکل ۱- مقایسه میانگین مرکب اثر اکوتیپ و محلول پاشی بر میزان پراکسید هیدروژن برگ ماریتیغال

**Figure 1. Combined means comparison of ecotype and foliar application effects on hydrogen peroxide amount of *Silybum marianum* ecotypes leaves**

Ti: Titanium dioxide, Ti NP: Nano titanium dioxide, Ch: Chitosan, and Ch NP: Nano chitosan

## بحث

شده است که کیتوزان باعث رشد، توسعه سلولی و در نتیجه افزایش عملکرد در گیاه می‌شود. کیتوزان با استفاده از افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم نیتروژن (نیترات ردوکتاز، گلوتامین و پروتازاستتاز) و بهبود انتقال نیتروژن باعث توسعه و رشد می‌شود (Mondal *et al.*, 2012). مطالعات انجام شده نشان داد که کیتوزان بر رشد بسیاری از گیاهان اثر قابل توجه داشته است (Emami Sathiyabama & Manikandan, 2021). (Bistgani *et al.*, 2017).

اثر کیتوزان بر بهبود رشد گیاه می‌تواند به دلیل بهبود فتوسنتز، افزایش جذب آب و عناصر ضروری و کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت باشد (Guan *et al.*, 2009). گزارش شده است که کیتوزان باعث افزایش و تنظیم رشد و نمو و عملکرد گیاه می‌شود (Wang *et al.*, 2015). همچنین در پژوهشی دیگر گزارش شد که کاربرد برگ کیتوزان بر رشد و ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه دارویی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، کاربرد الیستورهای کیتوزان و دی‌اکسیدتیتانیوم (نانو و بالک) سبب افزایش عملکرد بوته و فعالیت آنزیم‌های دفاعی در اکوتیپ‌های مختلف گیاه ماریتیغال گردید. همچنین مشاهده شد که کاربرد کیتوزان تأثیر بهتری در مقایسه با دی‌اکسیدتیتانیوم بر صفات مورد مطالعه داشت و این افزایش در فرم نانو نسبت به فرم بالک بیشتر بود. در این مطالعه بیشترین عملکرد بوته در اکوتیپ بوداکالازی مشاهده شد. عملکرد دانه می‌تواند ناشی از افزایش در اجزا عملکرد دانه باشد. همچنین بوته‌های با جثه بزرگتر و ساقه بلندتر برای حفظ ثبات گیاه و ذخیره‌سازی مواد غذایی و همچنین تعداد برگ بیشتر و بزرگتر برای دریافت حداکثر نور منجر به افزایش عملکرد گیاه می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد محلول پاشی با نانوکیتوزان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش عملکرد بوته به دلیل افزایش در اجزاء آن و ایجاد گیاهان با جثه بزرگتر و سطح برگ بیشتر شد. گزارش

غیره در بسیاری از گونه‌های گیاهی تیمار شده با الیستورها عمل می‌کند.

سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در حذف مقادیر زیاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز رادیکال سوپراکسید تولید شده به وسیله زنجیره انتقال الکترون در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها را با تولید پراکسید هیدروژن از بین می‌برد. پراکسید هیدروژن نیز به وسیله آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های مختلف سلول از بین برده می‌شود. آنزیم کاتالاز نیز پراکسید هیدروژن تولید شده در مسیرهای تنفس نوری درون پراکسی‌زوم‌ها را از بین می‌برد (Jahani et al., 2019). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد محلول پاشی الیستورهای کیتوزان و دی‌اکسیدتیتانیوم (نانو و بالک) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی در گیاه ماریتیغال می‌شود. یافته‌های ما نشان داد که الیستورها باعث تجمع پراکسید هیدروژن در گیاه ماریتیغال می‌شود. ظاهراً افزایش تجمع پراکسید هیدروژن در گیاهان تیمار شده با الیستورها ممکن است آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را فعال کرده باشد تا با افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از الیستورها مقابله کند. این افزایش در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکیتوزان بیشتر مشاهده شد. گزارش شده است که کیتوزان فعالیت آنزیم‌های مهارکننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله کاتالاز و پراکسیداز و آنزیم‌های مرتبط با دفاع مانند فنیل‌آلانین آمونیا لایاز (Phenylalanine ammonia lyase) و کیتیناز (Chitinase) را تحریک می‌کند (Fooladi Vanda et al., 2019). مشابه نتایج بدست آمده، کاربرد خارجی کیتوزان باعث افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در برخی گیاهان شد (Xu et al., 2020). همچنین کیتوزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را در برگ گیاه ماریتیغال افزایش داده است (Safikhan et al., 2018). گزارش شده است که نانو کیتوزان چندین آنزیم مرتبط با دفاع (پلی‌فنل اکسیداز (Polyphenol oxidase)، بازدارنده‌های پروتئاز (Protease inhibitors)، کیتوزاناز (Chitosanase)، بتا-۱،۳ گلوکاناز (β-1,3glucanase) و پراکسیداز) را در

همیشه بهار تأثیر گذاشته و به عنوان عامل مثبتی در بسیاری از ویژگی‌های مورفولوژیکی و رشد (ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی) مؤثر است (Hussaini Begum et al., 2013). کیتوزان به عنوان یک الیستور زیستی برای تحریک رشد گیاه، یک اصلاح‌کننده تنش غیر زنده و یک عامل مقاوم در برابر عوامل بیماری‌زاست. با این حال، این پاسخ‌ها پیچیده هستند و به غلظت و ساختارهای مبتنی بر کیتوزان، گونه‌های گیاهی و مرحله رشد بستگی دارند (Qavami et al., 2017).

نتایج بررسی صفات بیوشیمیایی نشان داد که میزان پراکسید هیدروژن، نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدئید در گیاهان حاصل از اکوتیپ بوداکالازی در مقایسه با دیگر ارقام کمتر مشاهده شد که این اختلاف بین گیاهان حاصل از پنج اکوتیپ مربوط به تفاوت ژنتیکی آنها می‌باشد. در میان تیمارهای مختلف، محلول پاشی نانوکیتوزان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از نظر صفات ذکر شده تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. قرار گرفتن در معرض نانوذرات منجر به عوارض جانبی سمی مانند افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیداسیون لیپیدی، اختلال در عملکرد میتوکندری و نشت یون به فضای بین سلولی می‌شود (Hossain et al., 2015). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که این غلظت نانوکیتوزان برای گیاه ماریتیغال سمیت ایجاد نکرده و باعث تخریب غشاء سلول نشده است.

گزارش شده است که الیستورها انفجار اکسیداتیو به‌ویژه تولید پراکسید هیدروژن را تحریک می‌کنند (Pichyangkura & Chadchawan, 2015). Chamnanmanoontham و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که کیتوزان تولید پراکسید هیدروژن را با بیان NADPH اکسیداز در برنج افزایش داد. NADPH اکسیداز گیاهان، مسیرهای سیگنال‌دهی را در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی تنظیم می‌کنند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سیگنال‌دهی داخل و خارج سلولی نقش دارد. تولید این مولکول‌ها به عنوان سیگنالی برای سنتز مواد شیمیایی دفاعی مانند فنولیک‌ها، فلاونوئیدها، فیتوالکسین، آنزیم‌های دفاعی و

- gene expression modulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161: 166-175.
- Anitha, A., Rani, V.D., Krishna, R., Sreeja, V., Selvamurugan, N., Nair, S.V. and Jayakumar, R., 2009. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 78(4): 672-677.
  - Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44: 276-287.
  - Chamnanmanoontham, N., Pongprayoon, W., Pichayangkura, R., Roytrakul, S. and Chadchawan, S., 2015. Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. *Plant Growth Regulation*, 75(1): 101-114.
  - Crabtree, R.H., 1998. A new type of hydrogen bond. *Science*, 282(5396): 2000-2001.
  - Divya, K., Thampi, M., Vijayan, S., Shabanamol, S. and Jisha, M.S., 2022. Chitosan nanoparticles as a rice growth promoter: evaluation of biological activity. *Archives of Microbiology*, 204(1): 1-11.
  - Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M., 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal*, 5(5): 407-415.
  - Fadhil, A.B., Ahmed, K.M. and Dheyab, M.M., 2012. *Silybum marianum* L. seed oil: a novel feedstock for biodiesel production. A novel feedstock for biodiesel production. *Arabian Journal of Chemistry*, 10: S683-S690.
  - Fooladi Vanda, G., Shabani, L. and Razavizadeh, R., 2019. Chitosan enhances rosmarinic acid production in shoot cultures of *Melissa officinalis* L. through the induction of methyl jasmonate. *Botanical Studies*, 60(1): 26.
  - Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Salimi, A. and Golparvar, A., 2017. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. *Scientia Horticulture*, 217: 114-122.
  - Guan, Y.J., Hu, J., Wang, X.J. and Shao, C.X., 2009. Seed priming with chitosan improves maize stress germination and seedling growth in relation to physiology changes under low temperature. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(6): 427-433.
  - Hossain, Z., Mustafa, G. and Komatsu, S., 2015. Plant responses to nanoparticle stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11): 26644-26653.
  - Hu, J., Wu, X., Wu, F., Chen, W., White, J. C., Yang, Y. and Wang, X., 2020. Potential application of
- برگ‌های گیاه ارزن انگشتی الفاء کرد ( Sathiyabama & Manikandan, 2021). از سازوکار خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد کیتوزان ممکن است به ساختار خاص آن مربوط باشد که از شمار زیادی گروه آمین و هیدروکسیل قابل دسترس تشکیل شده که با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان می‌دهد (Xie et al., 2001). همچنین، Ma و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش کرده‌اند که کیتوزان دارای قابلیت سیستم‌های مهارکننده مانند پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز است.
- به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد کیتوزان و دی‌اکسیدتیتانیوم در هر دو فرم بالک و نانو در افزایش عملکرد دانه و فعالیت آنزیم‌های دفاعی اثر قابل توجهی داشت و کاربرد نانوکیتوزان با غلظت مناسب (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان یک محرک زیستی کارآیی بیشتری در بهبود عملکرد ماریتیغال داشت. براساس نتایج این پژوهش چنین استنباط می‌شود که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با اعمال الیسیتورها از آثار فعالیت آنزیمی گیاه ماریتیغال برای کنترل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که مانع آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش رشد می‌شود. در این مطالعه اکوتیپ بوداکالازی از نظر افزایش عملکرد دانه و فعالیت آنزیم‌های دفاعی از سایر اکوتیپ‌ها برتر بود، ازاین‌رو استفاده از این اکوتیپ همراه با محلول‌پاشی نانوکیتوزان می‌تواند راهکار مناسبی برای افزایش عملکرد این گیاه باشد. همچنین استفاده از این اکوتیپ در برنامه‌های اصلاحی با توجه به عملکرد بالاتر قابل توصیه است.

## References

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12): 1337-1344.
- Ali, E.F., El-Shehawi, A.M., Ibrahim, O.H.M., Abdul-Hafeez, E.Y., Moussa, M.M. and Hassan, F.A.S., 2021. A vital role of chitosan nanoparticles in improvisation the drought stress tolerance in *Catharanthus roseus* (L.) through biochemical and

- physiological and morphological properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.) under water deficit. *Journal of Plant Ecophysiology*, 8(27): 56-71.
- Mishra, V., Mishra, R.K., Dikshit, A. and Pandey, A.C., 2014. Interactions of nanoparticles with plants: an emerging prospective in the agriculture industry: 159-180. In: Ahmad, P. and Rasool, S., (Eds.). *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Volume 1-Biological Techniques*, Academic Press, 551p.
  - Mondal, M.A., Malek, M.A., Puteh, A.B., Ismail, M.R., Ashrafuzzaman, M. and Naheer, L., 2012. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. *Australian Journal of Crop Science*, 6(5): 918-921.
  - Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
  - Pais, I., 1983. The biological importance of titanium. *Journal of Plant Nutrition*, 6: 3-131.
  - Pichyangkura, R. and Chadchawan, S., 2015. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196: 49-65.
  - Qavami, N., Naghdi Badi, H., Labbafi, M.R., Mehregan, M., Tavakoli, M. and Mehrafarin, A., 2017. Overview on chitosan as a valuable ingredient and biostimulant in pharmaceutical industries and agricultural products. *Trakia Journal of Sciences*, 1: 83-91.
  - Ram, G., Bhan, M.K., Gupta, K.K., Thaker, B., Jamwal, U. and Pal, S., 2006. Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Fitoterapia*, 76(2): 143-147.
  - Safikhan, S., Khoshbakht, K., Chaichi, M.R., Amini, A. and Motesharezadeh, B., 2018. Role of chitosan on the growth, physiological parameters and enzymatic activity of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) in a pot experiment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 10: 49-58.
  - Sathiyabama, M. and Manikandan, A., 2021. Chitosan nanoparticle induced defense responses in finger millet plants against blast disease caused by *Pyricularia grisea* (Cke.) Sacc. *Carbohydrate Polymers*, 154: 241-246.
  - Schaller, R.D. and Klimov, V.I., 2004. High efficiency carrier multiplication in PbSe nanocrystals: implications for solar energy conversion. *Physical Review Letters*, 92(18): 186601.
  - Suhas, D.P., Aminabhavi, T.M., Jeong, H.M. and Raghu, A.V., 2015. Hydrogen peroxide treated graphene as an effective nanosheet filler for separation application. *RSC Advances*, 5(122): 100984-100995.
  - titanium dioxide nanoparticles to improve the nutritional quality of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Hazardous Materials*, 389: 121837.
  - Hussaini Begum, M., Taheri, G.H., Vaezi Kakhaki, M.R. and Tlaty, M., 2013. Foliar application of chitosan on growth and morphological characteristics of marigold (*Calendula officinalis*). *National Conference of Passive Defense in the Agricultural Sector*, 21 November.
  - Jahani, S., Saadatmand, S., Mahmoodzadeh, H. and Khavari-Nejad, R.A., 2019. Effect of foliar application of cerium oxide nanoparticles on growth, photosynthetic pigments, electrolyte leakage, compatible osmolytes and antioxidant enzymes activities of *Calendula officinalis* L. *Biologia*, 74(9): 1063-1075.
  - Karvar, M., Azari, A., Rahimi, A., Maddah-Hosseini, S. and Ahmadi-Lahijani, M.J., 2022. Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>-NPs) enhance drought tolerance and grain yield of sweet corn (*Zea mays* L.) under deficit irrigation regimes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(2): 1-14.
  - Khan, M.N., AlSolami, M.A., Basahi, R.A., Siddiqui, M.H., Al-Huqail, A.A., Abbas, Z.K., Siddiqui, Z.H., Ali, H.M. and Khan, F., 2020. Nitric oxide is involved in nano-titanium dioxide-induced activation of antioxidant defense system and accumulation of osmolytes under water-deficit stress in *Vicia faba* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190: 110152.
  - Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J., 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3): 389-398.
  - Ma, L.J., Li, Y.Y., Wang, L.L., Li, X.M., Liu, T. and Bu, N., 2014. Germination and physiological response of wheat (*Triticum aestivum*) to pre-soaking with oligochitosan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(4): 766-770.
  - Ma, X., Wang, Q., Rossi, L. and Zhang, W., 2015. Cerium oxide nanoparticles and bulk cerium oxide leading to different physiological and biochemical responses in *Brassica rapa*. *Environmental Science and Technology*, 50(13): 6793-6802.
  - MacAdam, J.W., Nelson, C.J. and Sharp, R.E., 1992. Peroxidase-activity in the leaf elongation zone of tall fescue. 1. Spatial-distribution of ionically bound peroxidase-activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiology*, 99(3): 872-878.
  - Maehly, A.C., 1954. Assay of catalases and peroxidases: 357-424. In: Glick, D., (Ed.). *Methods of Biochemical Analysis* (Vol. 1). Academic Press, New York, 528p.
  - Malekpoor, F., Salimi, A. and Ghasemi Pirbalouti, A., 2017. Effect of bioelicitor of chitosan on

- Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 11(13): 1699-1701.
- Xu, D., Li, H., Lin, L., Liao, M.A., Deng, Q., Wang, J., Lv, X., Deng, H., Liang, D. and Xia, H., 2020. Effects of carboxymethyl chitosan on the growth and nutrient uptake in *Prunus davidiana* seedlings. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(4): 661-668.
  - Zhao, S., Xu, C.C., Zou, Q. and Meng, Q.W., 1994. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues. *Plant Physiology Communications*, 30(3): 207-210.
  - Thakur, R.K., Prasad, P., Savadi, S., Bhardwaj, S.C., Gangwar, O.P. and Kumar, S., 2022. Nanotechnology for agricultural and environmental sustainability: 413-424. In: Goel, R., Soni, R., Suyal, D.C. and Khan, M., (Eds.). *Survival Strategies in Cold-adapted Microorganisms*. Springer, Singapore, 435p.
  - Wang, M., Chen, Y., Zhang, R., Wang, W., Zhao, X., Du, Y., Yin, H., 2015. Effects of chitosan oligosaccharides on the yield components and production quality of different wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) in Northwest China. *Field Crops Research Journal*, 172: 11-20.
  - Xie, W.M., Xu, P.X. and Liu, Q., 2001. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives.

## Effects of chitosan and titanium dioxide (bulk and nano) foliar application on yield and biochemical responses of *Silybum marianum* (L. Gaertn.) ecotypes

S. Jafari<sup>1</sup>, S. Mousavi-Fard<sup>2\*</sup>, A. Rezaei Nejad<sup>3</sup>, H. Mumivand<sup>3</sup> and K. Sorkheh<sup>4</sup>

1- Ph.D. student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

E-mail: Sadeghmosavifard@gmail.com; Mousavifard.s@lu.ac.ir

3- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

4- Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Received: January 2022

Revised: May 2022

Accepted: June 2022

### Abstract

Milk thistle (*Silybum marianum* (L. Gaertn.)) is a plant with various medicinal uses which is adapted to different climates. To investigate the effects of different concentrations of chitosan (CS) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) on increasing yield and biochemical indices of milk thistle ecotypes, a farm factorial experiment was conducted in a randomized complete block design with three replications during two crop years. Experimental treatments included milk thistle ecotype at five levels (Budakalazi, Sari, Khomein, Khorramabad, and Ahvaz) and type and elicitor concentration at nine levels (foliar application of distilled water (control), bulk CS (50 and 100 mg L<sup>-1</sup>), nano CS (50 and 100 mg L<sup>-1</sup>), bulk TiO<sub>2</sub> (50 and 100 mg L<sup>-1</sup>), and nano TiO<sub>2</sub> (50 and 100 mg L<sup>-1</sup>)). The results showed that foliar application of CS and TiO<sub>2</sub> (bulk and nano) effectively increased yield and defense enzymes. In all these traits, foliar application of CS and TiO<sub>2</sub> in nano form was more effective compared to the bulk form and control. Based on the mean comparisons results, the plant yield increased with foliar application of nano CS at the concentration of 50 mg L<sup>-1</sup>. Also, foliar application of nano CS at the concentration of 100 mg L<sup>-1</sup> increased the activity of defense enzymes. In general, foliar application of nano CS increased the yield as well as improved the biochemical traits of milk thistle ecotypes, especially the Budakalazi one, which could be considered as a suitable way to increase the yield of this plant. Considering the higher yield of Budakalazi ecotype, it could be also recommended to be used in breeding programs.

**Keywords:** Nano chitosan, defense enzymes, elicitor, malondialdehyde, Budakalazi.